



Studies on the Cell Membrane Permeable Oligoarginine Derivatives for Cancer Cell Specific Drug Delivery

著者	菅井 祥加
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17878号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123069

博士論文

**Studies on the Cell Membrane Permeable
Oligoarginine Derivatives
for Cancer Cell Specific Drug Delivery**

(がん細胞選択的薬物送達を指向した
オリゴアルギニン誘導体開発に関する研究)

菅井 祥加

平成 29 年

論 文 目 次

General Introduction

Chapter 1. Peptide Ribonucleic Acid-Phenylboronic Acid-Peptide Nucleic Acid-Arginine Hybrids: Effects of Arginine Residues on Aggregation, Cellular Uptake, and Cytotoxicity

Chapter 2. Peptide Ribonucleic Acid-Arginine Hybrids: Effects of Arginine Residues Alternatingly Introduced to PRNA Backbone on Aggregation, Cellular Uptake, and Cytotoxicity

Chapter 3. Development of MMP-Activatable PEGylated Oligoarginine for Cancer Cell Specific Intracellular Delivery

Chapter 4. Application of MMP-Activatable PEGylated Oligoarginine for Cancer Cell Specific Drug Delivery

General Conclusion

Acknowledgements

論文内容要旨

【序論】

がんは、日本そして世界において、罹患数・死亡数ともに上位を占める疾患であり、その治療法の確立は未だ重要な課題である。2000 年以降、世界の医薬品市場は低分子医薬から抗体医薬を中心としたバイオ医薬へ移行し、ここ数年では、抗体医薬を代替・相補する次世代の分子標的医薬として、核酸医薬が注目されている。核酸医薬は主に疾患に関連する RNA を標的とし、核酸誘導体を用いた標的 RNA の機能制御によって薬効を発現する治療薬である。現在までに、標的 RNA との親和性向上や生体内酵素耐性の向上を目指し、数多くの核酸誘導体が開発されてきた。しかし、標的親和性が高い誘導体は高い活性が期待できる一方で、類似配列を有する非標的 RNA とも複合体を形成してその機能を抑制するオフターゲット効果と呼ばれる副作用を惹起することが深刻な課題となっている。加えて、核酸医薬の効率的な細胞内送達も重要な課題であり、早急な解決が切望されている。

本博士論文では、上記の課題の解決策として「I. 全ての細胞への効率的送達能およびがん細胞選択的薬効発現能を併せ持つ核酸誘導体の開発 (第 1、2 章)」、「II. がん細胞選択的薬物送達キャリアの開発 (第 3、4 章)」の二つの戦略に基づき、細胞膜透過性が乏しい薬物の細胞内送達ツールとして広く用いられている膜透過性ペプチド、オリゴアルギニン (Arg) に着目した誘導体開発および機能評価に取り組んだ。

【第 1 章】オリゴアルギニンを導入したペプチドリボ核酸-フェニルボロン酸-ペプチド核酸の細胞内取り込みの等特性に関する検討

がん細胞は、正常細胞と比較して酸性環境になることが報告されており、当研究室ではこの pH 低下をトリガーとする薬効発現の候補化合物としてペプチドリボ核酸 (PRNA) を報告してきた。PRNA は、弱酸性環境下でのみ、標的 RNA と複合体を形成してその機能を抑制し、核酸医薬としての薬効を発現する。そのため PRNA は、正常細胞では薬効発現せず、オフターゲット効果の心配がない安全ながん細胞選択的核酸誘導体として期待されている。PRNA の細胞膜透過性を向上できれば、実用化に向け、大きく前進することができる。

以上の背景を踏まえ、本章では、既に当研究室で pH 依存的な標的核酸認識能を示すことが確認されている P_RBPR と名付けた PRNA-フェニルボロン酸 (PBA)-ペプチド核酸 (PNA) 複合体に対するオリゴ Arg の導入を検討した。Arg を 4 残基ずつ *N* および *C* 末端に連続して導入した P_RBPR1 ならびに *N* 末端に 8 残基連続して導入した P_RBPR2 を設計・合成し、主に細胞内取り込み能を評価した。一般に、オリゴ Arg の細胞膜透過性は分子全体の親・疎水性のバランスに影響を受けるため、同じ数の Arg 残基数を導入した P_RBPR1 、 P_RBPR2 においても、異なる特性を示すことが予想された。細胞膜透過性は、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞への取り込みを共焦点レーザー顕微鏡ならびにフローサイトメトリーによって評価した。その結果、 P_RBPR1 および P_RBPR2 は、ともに pH 依存的な高い凝集性を示し、 P_RBPR1 に関しては形成した粒子が細胞膜上に留まり、細胞内へは導入されないことが明らかとなった。 P_RBPR2 は、細胞質へ拡散する高い細胞膜透過性を示したが、濃度上昇に伴う深刻な細胞毒性が観

測され、細胞膜透過性と細胞毒性のトレードオフの関係が分子設計における重大な課題であることを明らかにした。

【第 2 章】 ペプチドリボ核酸へ導入するアルギニン残基数が細胞内取り込み等の特性に与える影響の検討

第 1 章の結果を踏まえ、本章では、新たに PRNA と Arg の交互配列を持つ P_RR を細胞導入モジュールと規定し、その特性を検討した。PRNA と Arg を交互に配列することで、連続配列のような Arg の正電荷の集中に基づく、細胞毒性ならびに標的 RNA 等とのポリオンコンプレックス形成の軽減を期待した。一般に、オリゴ Arg の細胞膜透過性は、Arg 残基数や被送達分子に影響されやすいため、分子構造と細胞膜透過性等の相関を系統的かつ論理的に検討することは、分子設計において重要な課題である。そこで、PRNA の塩基数を 12 量体に固定し、導入する Arg 残基数を 12 (P_RR1)、8 (P_RR2)、4 (P_RR3) とした誘導体を設計・合成し、それらの細胞膜透過性を、HeLa 細胞を用いて詳細に検討した。その結果、P_RR1 は高い凝集性を示し、P_RR3 はほとんど細胞内へ取り込まれないことが明らかとなった。一方、Arg を 8 残基導入した P_RR2 は、同じ Arg 残基数を持つペプチド R8 と比較して約 3 倍もの高い細胞内取り込みを示し、細胞毒性も示さない優れた特性を有する事を明らかとした。取り込み機構について詳細に検討した結果、P_RR2 の優れた細胞内移行には、(1) 適切な親・疎水性バランス、(2) 細胞膜との効果的な相互作用、(3) エンドサイトーシス経路の中でも特にマクロピノサイトーシスを主な経路とする細胞内取り込み、が重要である事を見出した。

以上の結果より、PRNA へ導入する Arg 残基数には最適値が存在し、PRNA12 量体の場合には Arg 残基数 8 が最適値である事を明らかとした。効率的な細胞内送達に必要な Arg 数を見出し、高効率細胞内送達と低毒性を両立する P_RR の設計戦略の指針構築に成功した。

【第 3 章】 マトリックスメタロプロテアーゼ活性型ポリエチレングリコール複合化オリゴアルギニンを用いたがん細胞選択的細胞内送達キャリアの開発

本章では、がん細胞選択的薬物送達キャリアの開発を目的とし、オリゴ Arg と、がん細胞特異的分泌酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の基質ペプチド、生体適合性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を複合化した新しい細胞内送達キャリアの設計・合成に取り組んだ。本設計では、MMP 基質ペプチドを介してオリゴ Arg と PEG を連結することで、PEG 鎖による血中安定性の確保とオリゴ Arg 由来の細胞膜透過機能の抑制を期待した。一方、MMP が特異的に高発現するがん細胞付近では、リンカーとなる MMP 基質ペプチドが分解することにより PEG 鎖の解離が起こり、オリゴ Arg の細胞膜透過機能が発現することを期待した。本章では、本提案の概念実証実験として、蛍光色素であるフルオレセイン (FL) を被送達分子として選定し、FL 導入 MMP 応答型 PEG 複合化オリゴ Arg (PEG-mmpR7-FL) を設計・合成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその細胞内送達挙動を検討した。分子量 5000 の直鎖型 PEG を有する PEG-mmpR7-FL は、MMP による認識・分解特性を維持しつつ、細胞内への取り込みが大きく抑制されることが明らかとなった。オリゴ Arg 誘導体のゼータ電位が、PEG

複合化により正の値から負の値へと変化したことから、PEG 導入によるオリゴ Arg の効果的なシールディングが実現されたことが示唆された。さらに、ヒト線維肉腫由来 HT-1080 細胞の三次元スフェロイド評価系において、培養液中に存在する内在性 MMP により PEG-mmpR7-FL の細胞膜透過性が活性化されることを明らかにした。MMP 阻害剤の添加によって細胞膜透過が阻害されたことから、MMP による PEG-mmpR7-FL の細胞膜透過の活性化が強く支持された。以上の結果より、がん細胞で特異的に高発現する MMP によって細胞膜透過性が活性化される PEG 化オリゴ Arg を用いた、新しいがん細胞選択的分子送達キャリアの開発に成功した。

【第 4 章】マトリックスメタロプロテアーゼ活性型ポリエチレングリコール複合化オリゴアルギニンを用いたがん細胞選択的薬物送達

本章では、第 3 章で開発した MMP 活性型 PEG 複合化オリゴ Arg を薬物送達に応用することを目的とし、抗がん剤として広く用いられているドキソルビシン (DOX) をモデル薬剤として連結させた PEG-mmpR7-DOX の設計、合成および *in vitro* レベルでの機能評価を行った。PEG-mmpR7-DOX は、送達された DOX が細胞内でキャリアから解離できるようにするため、ジスルフィド結合を介して MMP 活性型 PEG 複合化オリゴ Arg と連結させた。HT-1080 細胞の三次元スフェロイド評価系を用いて、PEG-mmpR7-DOX の投与による細胞増殖抑制能を検討した結果、MMP 阻害剤の有無によって、その細胞増殖抑制能に有意差 ($P < 0.05$) が認められた。この結果は、第 3 章で得られた結果とも一致しており、本研究において設計した MMP 活性型 PEG 複合化オリゴ Arg が薬物送達へ応用できることを明らかにした。

【結論】

以上、本博士研究では、がん細胞を標的とした核酸医薬の実用化に向けた二つの戦略に基づく、オリゴ Arg 誘導体を合成・設計し、その機能評価を行った。高い細胞膜透過性と低毒性を両立する Arg 導入 PRNA の設計・合成および、MMP 活性型 PEG 化オリゴ Arg を用いた薬物送達キャリアの開発を達成すると共に、これらの合理的設計・開発戦略の構築に成功した。本研究成果は、がんを標的とした核酸医薬の発展に大いに貢献でき、本博士論文で見出した戦略に基づく薬剤送達システムの発展が期待される。